

COMPORTAMENTO *IN VITRO* DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR IAC.

ISABELLE OLIVEIRA¹; ALEXANDRE P. B. BOER²; CAMILA S. FESTUCCI²; DÉBORA
M. SANSOLI²; LUCIANA R. PINTO²; SILVANA CRESTE³

Nº 10116

RESUMO

A cultura de tecidos oferece uma oportunidade para produção rápida e em larga escala de variedades de cana-de-açúcar, livres de patógenos. No entanto, a produção de plantas fora de padrão ou variantes somaclonais é um dos principais obstáculos para a propagação comercial e aceitação pelos produtores, fazendo-se necessário o conhecimento prévio do comportamento *in vitro* de cada genótipo a ser multiplicado. Também, a obtenção de plantas geneticamente modificadas requer uma análise prévia da performance do material *in vitro*. Este trabalho objetivou avaliar o comportamento *in vitro* de 20 genótipos de cana-de-açúcar pertencentes ao Programa Cana, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Plantas com idade de 6-12 meses foram cultivadas *in vitro*, utilizando-se explantes provenientes de meristema apical e disco foliar. Paralelamente, a capacidade de formação de calos embriogênicos foi avaliada para cada genótipo. Os resultados revelaram que foi possível multiplicar todos os genótipos *in vitro*, sendo que 10 genótipos (50%) foram capazes de regenerar plantas a partir de meristema apical, 16 (80%) foram capazes de regenerar plantas a partir de disco foliar, e 9 (45%), regeneraram plantas tanto a partir de meristema apical como de disco foliar. Também, dos 20 genótipos introduzidos, 14 (70%) foram capazes de produzir calos embriogênicos, sendo que capacidade de regeneração de plantas também foi dependente do genótipo, tendo-se identificado genótipos mais promissores para transformação genética.

ABSTRACT

The tissue culture provides an opportunity for rapid and large-scale sugarcane propagation. However, the production of off-type plants or somaclonal variants is one of the main obstacles to commercial propagation and acceptance by producers. So it is essential the prior knowledge of *in vitro* behavior of each genotype to be propagated. Also, the production of genetically modified plants requires a prior analysis of the performance of the genotypes *in vitro*. This work aimed to analyze the *in vitro* performance of 20 genotypes, belonged to Centro de Cana, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Plants with 6-12 months were cultivated *in vitro* using apical meristem and leaf roll explants. Besides, the ability to produce embryogenic callus was evaluated

for each genotype. The results showed that it was possible to propagate all genotypes in vitro, and 10 genotypes (50%) were able to regenerate plants from apical meristem, 16 (80%) were able to regenerate plants from leaf roll, and 9 (45%), produced plants from both explants. Furthermore, of the 20 genotypes introduced, 14 (70%) were able to produce embryogenic callus, and the regeneration potential was also genotype dependent. It was possible to identify genotypes more suitable for sugarcane transformation.

1 Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Barão de Mauá, Ribeirão Preto-SP, * isabellec.oliveira@hotmail.com

2 Colaborador: IAC/ Instituto Agronômico de Campinas, Ribeirão Preto-SP.

3 Orientadora: Pesquisadora, IAC/ Instituto Agronômico de Campinas, Ribeirão Preto-SP.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) é uma das principais culturas agrícolas do Brasil, sendo a principal fonte de matéria prima para a produção de açúcar e etanol combustível.

Para os plantios comerciais, a cana-de-açúcar é propagada vegetativamente a partir de segmentos de colmos, denominados toletes. No entanto, a propagação vegetativa da cana-de-açúcar expõe a planta à infecção com diversos patógenos, que se acumulam na planta ao longo dos ciclos de cultivo, resultando num declínio do potencial produtivo da variedade. Sendo assim, o desenvolvimento de uma metodologia mais eficiente para produção, em larga escala, de mudas de alta qualidade, isentas de patógenos, poderá contribuir significativamente com o desenvolvimento da canavicultura em áreas de expansão no Brasil e garantir os níveis de produção esperados. Nesse sentido, a cultura de tecidos oferece uma oportunidade para produção rápida e em quantidade de materiais livre de doenças, sendo empregada como suporte para propagação comercial em muitos países, inclusive o Brasil.

Também, a engenharia genética apresenta-se como importante complemento aos métodos convencionais de melhoramento de cana-de-açúcar. No entanto, os pré-requisitos para aplicação da engenharia genética são sistemas de transformação e de regeneração eficientes, este último capaz de regenerar as plantas transformadas (Li et al., 1996).

2. OBJETIVOS

- Avaliar a resposta de cada variedade IAC micropropagada, quando utilizado meristema apical e disco foliar como fonte de explante, bem como avaliar, para cada genótipo, a capacidade de formação de calos embriogênicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 - Material vegetal: um total de 20 genótipos de cana-de-açúcar, foram introduzidos *in vitro*: IACSP02-3174; IACSP01-6444; IACSP02-3168; IACSP03-2107; IACSP02-3120; IACSP02-1142; IACSP01-6410; IACSP01-2415; IACSP95-5000; IACSP96-2100; IACSP96-2008; IACSP96-1021; IACSP99-2014; IACSP99-1418; IACSP99-1309; IACSP99-4007; IACSP97-7543; IACSP91-1099; IACSP96-2042; IACSP97-7018.

3.2 - Preparo dos explantes para introdução em meio de cultura: Duas fontes de explantes foram utilizadas: meristema apical e discos foliares. Ponteiros de cada genótipo com idade entre 6 a 12 meses foram coletados no campo e levados para o laboratório, retirando-se de uma das camadas externa de folhas. Após, estes foram levados para o fluxo laminar, desinfetados com etanol 70% por 10 minutos, seguido de água sanitária 60% (v/v) por 15 minutos, e posteriormente, três lavagens em água Mili-Q autoclavada. Após, foram retiradas camadas de folhas para expor o palmito, contendo 5-6 folhas enroladas. Para disco foliar, cada palmito foi cortado em discos (seções) transversais, com espessura de 1-2 mm, e colocado em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado 7g l⁻¹ ágar, 0,15g l⁻¹ ácido cítrico, 5mg l⁻¹ ácido naftalenoacético (ANA) e, 5mg l⁻¹ de cinetina (Kin), conforme proposto por Gill et al., (2006). Os frascos foram incubados por 3-5 dias no escuro, e depois incubados a 26 ± 1°C sob fotoperíodo de 16 h, com densidade de fluxo de fótons de 30 μM m⁻² s⁻¹. A cada três semanas, as culturas foram transferidas para meio fresco. Após, as plântulas foram subcultivadas em meio MS líquido de multiplicação, suplementado com 20g de sacarose, 0,9μM Benzilamino purina (BAP) e 0,46μM de Cinetina (Kin), trocando-se o meio a cada 2 semanas, por 5 subcultivos. Posteriormente, as plantas foram enraizadas em meio MS contendo 40 g l⁻¹ de sacarose, 10μM ANA por 15 dias. Para meristema apical, foi utilizado o mesmo procedimento de desinfecção. Os meristemas foram retirados e colocados em meio MS líquido, suplementado com 20 g de sacarose, 0,9 μM BAP e 0,46 μM de Kin. Após a diferenciação total, as plântulas foram subcultivadas como descrito anteriormente. Paralelamente, cada genótipo foi testado quanto à capacidade de produção de calos embriogênicos, seguindo o mesmo procedimento descrito para discos foliares, exceto a utilização de 3 mg l⁻¹ 2,4D (Dichlorophenoxyacetic acid) como fonte exclusiva de hormônio. Os frascos contendo os discos foram colocados no escuro para produção dos calos, os quais foram

subcultivados por 60-90 dias. Após, estes foram transferidos para meio sólido na mesma composição descrita para discos foliares para diferenciação em plantas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Micropropagação dos genótipos: Todos os genótipos apresentaram capacidade de regeneração e multiplicação *in vitro*. A capacidade de regeneração foi influenciada pelo genótipo, idade da planta e tipo de explante. Assim, 10 genótipos (50%) foram capazes de regenerar plantas a partir de meristema apical, 16 (80%) foram capazes de regenerar plantas a partir de disco foliar, e 9 (45%), regeneraram plantas tanto a partir de meristema apical como de disco foliar (Tabela 1) Para disco foliar, uma maior intensidade de regeneração foi observada com plantas com idade de 8-9 meses, coletadas no início do outono, em início de indução floral. A intensidade de regeneração de explantes oriundos de disco foliar variou entre os genótipos, tendo-se observado genótipos com alta, média e baixa capacidade de regeneração.

Para meristema apical, explantes provenientes de plantas com idade de 6-9 meses apresentaram maior capacidade e velocidade de regeneração. A taxa de multiplicação foi dependente do genótipo, fonte de explante e ciclo de subcultivo, a qual foi em média 1:3; 1:5; 1:10; 1:10; 1:10 para os subcultivos 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Para explantes provenientes de disco foliar, a taxa de multiplicação no primeiro subcultivo foi muito mais elevada, em função do grande número de plântulas regeneradas por explante.

4.2 - Resposta dos genótipos quanto à produção de calos embriogênicos.

A produção de calos embriogênicos é uma etapa fundamental para a transformação genética da cana-de-açúcar, seja por métodos diretos (*Agrobacterium tumefaciens*) ou indiretos (Biolística). No entanto, a capacidade de regeneração dos calos é altamente dependente do genótipo, daí a necessidade de se conhecer o potencial daqueles materiais promissores para transformação. Dos 20 genótipos avaliados, 14 (70%) produziram calos embriogênicos (Fig. 1) e foram capazes de regenerar plantas (Tabela 1). No entanto, a capacidade de regeneração de plantas também foi altamente dependente do genótipo, tendo genótipos com alta, média e baixa capacidade de regeneração (Fig. 2). O genótipo IACSP 91-1099 constitui uma das principais variedades do programa cana IAC. No entanto não é capaz de produzir calos embriogênicos, e, portanto, não é possível obter plantas geneticamente modificadas dessa variedade pelas metodologias atualmente disponíveis. Os genótipos IACSP96-2042; IACSP95-5000; IACSP96-2100 foram os melhores na produção e capacidade de regeneração de calos embriogênicos.



Figura 1 - Regeneração de plantas de cana-de-açúcar a partir de explantes oriundos de calos embriogênicos, nos genótipos IACSP96-2042 (1A); IACSP95-5000 (1B); IACSP96-2100 (1C).

Tabela 1 – Capacidade de regeneração de genótipos de cana-de-açúcar *in vitro*, em função do tipo de explante utilizado.

Genótipo	Disco Foliar	Meristema Apical	Calo Embriogênico
IACSP 02-3174	✓	✓	✓
IACSP 01-6444	✓	✓	✓
IACSP 02-3168	✓	✓	-
IACSP 03-2107	✓	✓	✓
IACSP 02-3120	✓	✓	✓
IACSP 02-1142	✓	✓	✓
IACSP 01-6410	✓	✓	✓
IACSP 01-2415	✓	✓	-
IACSP 95-5000	-	✓	✓
IACSP 96-2100	✓	✓	✓
IACSP 96-2008	✓	-	✓
IACSP 96-1021	✓	-	✓
IACSP 99-2014	✓	-	-
IACSP 99-1418	✓	-	✓
IACSP 99-1309	✓	-	✓
IACSP 99-4007	✓	-	-
IACSP 97-7543	✓	-	✓
IACSP 91-1099	-	-	-
IACSP 96-2042	-	-	✓
IACSP 97-7018	-	-	-

Um dos fatores observados que possivelmente inibiu a regeneração e a produção de calos embriogênicos foi a oxidação dos genótipos, causando a liberação de compostos fenólicos em meio de cultura e consequentemente, o escurecimento do explante.

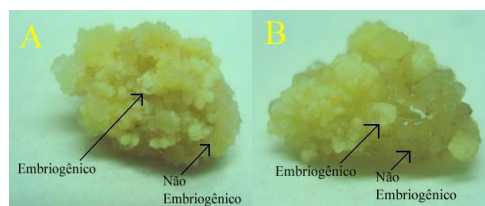


Figura 2 - Produção de calos embriogênicos nos genótipos IACSP96-2008 (2A); IACSP95-5000 (2B).

Os resultados obtidos neste trabalho foram fundamentais para otimizar a produção em escala de mudas de cana-de-açúcar bem como para nortear as pesquisas com desenvolvimento de cana-de-açúcar geneticamente modificada que estão sendo conduzidas no Centro de Cana – IAC.

6. CONCLUSÕES:

- A introdução de genótipos jovens, com idade entre 6-9 meses, deve ser priorizada, visto que apresentou maior capacidade e velocidade de regeneração nos três tipos de explantes utilizados,
- A utilização de explantes provenientes de discos foliares, regenerados por organogênese direta ou embriogênese somática, deve ser priorizada para aqueles genótipos que respondem favoravelmente a esse sistema, visto que um maior número de plantas é produzido a partir de uma única planta em curto espaço de tempo;
- A produção de calos embriogênicos visando a transformação genética, mostrou-se altamente dependente do genótipo, tendo-se identificado genótipos mais promissores para transformação.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

- GILL, R.; MALHOTRA, P.K.; GOSAL, S.S. Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 84: p. 227-231, 2006.
- LI, H.Q.; SAUTTER, C.; POTRYKUS, I.; PUONTE-KAERLAS, J. Genetic transformation of cassava (*Manihot sculenta* Crantz). **Nature Biotechnol**, v.14, p. 736-740, 1996.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15:473–497, 1962.